

早稲田大学大学院 理工学研究科

博士論文審査報告書

論 文 題 目

Efficient Intracellular Delivery of Biomacromolecules by
Liposomes Containing Amino-acid Based Lipids

アミノ酸型脂質を用いたリポソームによる生体高分子の高効
率な細胞内運搬

申 請 者

小 幡	洋 輔
Yosuke	Obata

応用化学専攻 高分子化学研究

2009 年 2 月

近年、バイオテクノロジーの急速な進展に伴い疾患に関与する遺伝情報が次々に明らかとされ、従来のレディメイド医療(薬物治療)から患者の体質や年齢などに合わせたテーラーメイド医療が望まれる時代になってきた。とりわけ、治療方法が現存しない遺伝病などに対する革新的な治療法として遺伝子治療に期待が集まっている。これまで、治療用遺伝子の細胞導入に用いられてきたウィルスベクターは、安全面などの理由から現在では非ウィルスベクター(運搬体)に転換が計られつつあり、高い遺伝子発現効率かつ低毒性の非ウィルスベクターが求められている。また遺伝子導入のみならず、酵素補充療法や画像診断技術に応用される酵素やプローブ用抗体などの生体高分子を高効率に標的細胞に導入する技術は近年その役割が増大している。

このような背景の下、申請者は二分子膜小胞体(リポソーム)を利用した高効率な生体高分子の細胞内運搬に取り組んでいる。リポソームは、血中投与可能な薬物運搬体として既に臨床使用されている分子集合体であり、ドラッグデリバリーシステム(DDS)による治療効果の大幅な改善のみならず、副作用の軽減による「生活の質(QOL)」の改善などに大きく貢献している。そこで申請者は、所属研究室が中心となって開発してきた人工赤血球の構成成分として用いられているアミノ酸型脂質の利用に注目し、それらから調製されるリポソームを生体高分子の高効率な細胞導入法に用いることを検討している。具体的には、細胞内でのみ機能する薬物や蛋白質、遺伝子の運搬を目的としてアミノ酸型脂質を合成し、そのアミノ酸型脂質から成るリポソームが生体高分子の細胞内動態に関与する因子を明確にしながら、細胞内運搬を効率化するリポソームを最適化している。さらに、培養細胞への生体高分子の細胞導入のみならず、ガンや感染症などの疾病治療に有効な全身性の薬物送達システムの構築にも発展させている。本論文では、リポソーム構成成分である合成機能性アミノ酸型脂質から成るリポソームが、生体高分子を効率良く目的の部位(細胞内も含めた)に送達できる新しい運搬体を提案している。本論文は八章から構成されており、各章の概要とその評価内容を以下に記す。

第一章は、両親媒性分子から成る分子集合体の物理化学的な性質を記述し、分子集合体の形成とその *in vitro*, *in vivo* 利用に欠かせない特性についてまとめている。さらにナノメディシンの概論として、ミセル、高分子微粒子製剤などの他の DDS 製剤とリポソームの特徴を比較しながら、本論文の位置づけを明確にしている。

第二章は、遺伝子の細胞内運搬を目的として、その運搬体としての構造の異なるカチオン性アミノ酸型脂質の合成と分子集合形態に関する内容の記述である。両親媒性分子の極性頭部にカチオン性アミノ酸であるリシン、ヒスチジン、アルギニンを導入し、かつ疎水部のアルキル鎖長を3種類変化させた計9種類のカチオン性アミノ酸型脂質を高収率かつ簡便に合成している。さらにこれらのカチオン性アミノ酸型脂質が形成する分子集合形態を透過型電子顕微鏡観察から詳細に解析している。その結果、集合体形態はアルキル

鎖長よりも、極性頭部構造に依存することを明らかにし、ヒスチジンの系ではリポソーム形態よりもチューブ構造が得られることを見出している。更に各々の集合体の粒子径やゼータ電位、相転移温度などの解析結果と併せて、カチオン性アミノ酸型脂質の構造並びにそれらの分子集合特性が記述されており、遺伝子運搬を目的とした分子集合体の基礎検討の内容である。

第三章では、第二章で調製したカチオン性集合体を用いて遺伝子運搬能を *in vitro* 評価し、カチオン性アミノ酸型脂質の非ウィルスベクターとしての可能性について言及している。それぞれのカチオン性集合体とプラスミド DNA (pDNA) との複合体を調製し、その複合体の COS-7 細胞(アフリカミドリザル腎細胞)における遺伝子発現効率を測定したところ、1,5-Ditetradecyl N-lysyl-L-glutamate (**Lys-Glu2C₁₄**)及び 1,5-Ditetradecyl N-arginyl-L-glutamate (**Arg-Glu2C₁₄**)が最も遺伝子発現効率が高く、血清中における発現効率は市販の遺伝子導入試薬 LipofectamineTM2000 の約 10 倍であることを明らかにした。他方、アミノ酸型脂質の細胞傷害活性は、LipofectamineTM2000 と比較して約 1/50 程度であった。このことより、カチオン性アミノ酸型脂質は低毒性で高発現な遺伝子導入試薬として結論づけられ、市販試薬の性能を大幅に上回る成果は高く評価される。

第四章は、カチオン性アミノ酸型脂質を機能性蛋白質導入用リポソームに適用した内容である。機能性蛋白質として遺伝子組換えタンパク質 DMC1 を採用した。DMC1 は遺伝子組換えを補助する核内在性タンパク質であり、外部からの積極的な細胞核への導入により異常遺伝子の修復頻度の向上が期待できる。申請者はこれを 1,5-Dihexadecyl N-L-glutamate (**Lys-Glu2C₁₆**)を含むカチオン性リポソームに内包させて核までの細胞内運搬を試みている。DMC1 内包カチオン性リポソームを COS-1 細胞へ添加した後、ウェスタンブロット解析から細胞核分画に DMC1 が顕著に局在することを見出している。これは、市販の蛋白質導入試薬 BioPORTER では達成できない極めて高い効率であり、本カチオン性アミノ酸型脂質から成るリポソームは、機能性蛋白質を高効率に細胞内に導入する機能を有することまで確認できている。

第五章では、細胞内のエンドソーム内環境に応答するリポソームについて記述している。脂質の極性頭部にアミノ基とカルボキシル基を一对あるいは複数対持つ両イオン性アミノ酸型脂質を 6 種類合成し、両イオン性リポソームの pH 応答性に関する評価結果を述べている。極性頭部にグルタミン酸を用いた 1,5-Dihexadecyl N-glutamyl-L-glutamate (**GG**)や 1,5-Dihexadecyl N,N-diglutamyl-lysyl-L-glutamate (**GGLG**)では、pH の低下に伴ってゼータ電位がマイナスからプラスに変化するが、ゼータ電位がゼロとなる pH が異なっていることを明らかにしている(**GG**:pH4.7, **GGLG**:pH5.7)。これらの pH 応答性リポソームは、生理的 pH7.4 では血液適合性の高い弱アニオン性リポソームとして挙動し、エンドサイトーシスで細胞内に取込まれた際、エンドソーム内 pH でカチオン性リポソームへと変化する特性を示唆された。またこの

リポソームがエンドソーム膜との融合が期待できることを、生体モデル膜との融合度が増大する実験から示唆できており、細胞内運搬が期待できる pH 応答性リポソームの構築が達成できた内容となっている。

第六章は、第五章で構築した pH 応答性リポソームの細胞内での機能を *in vitro* 評価から明らかにしている。薬物モデルとしてドキソルビシン(DOX)を内包させた **GG** あるいは **GGLG** から成るリポソームを調製し、HeLa 細胞(子宮頸癌細胞)に添加した後の DOX の細胞内動態を共焦点顕微鏡によって観察している。非 pH 応答性の DPPC リポソームと比較して、pH 応答性の **GG** または **GGLG** リポソームでは、より多くの DOX がエンドソーム外に放出されて細胞核に集積していた。さらに **GGLG** リポソームでは、より高い細胞増殖抑制が認められたことから、pH 応答性リポソームが予想通りに細胞内で機能し、細胞内運搬を向上させる新しい薬物運搬体であることを実証できたことは高く評価できる。

第七章は、pH 応答性リポソームを遺伝子治療へと展開するため遺伝子運搬能を評価した内容である。**GGLG** リポソームに pDNA を内包させて血清存在下で HeLa 細胞に添加すると、従来の pH 応答性リポソーム(DOPE/CHEMS)よりも約 5 倍高い遺伝子発現効率が得られた。これは **GGLG** の pH 応答性により細胞内における遺伝子運搬能が著しく高くなったためであり、エンドソームから遺伝子を脱出させる pH 応答性リポソームの機能により、高い遺伝子発現効率を達成できたことは特筆すべき成果として認められる。

第八章では、異なる構造のアミノ酸型脂質を組み合わせで調製したリポソームを、細胞内外の環境に応じて特性を変化させる独創的なドラッグデリバリーシステムに関する将来展望を述べている。次世代型の運搬体についても言及し、テーラーメイド医療を実現するための運搬体に関する申請者の新しい提案も含まれている。

以上、本論文は、イオン状態の異なるアミノ酸を極性頭部としたアミノ酸型脂質から成る分子集合体の特性を巧みに利用して、従来困難とされていた遺伝子や蛋白質の細胞内運搬の効率を格段に高め、運搬体の毒性を大幅に低減させた内容であり、遺伝子や酵素、低分子薬剤を用いる現代のテーラーメイド治療に貢献する基盤的な成果として価値のあるものと認められる。また多機能なアミノ酸型脂質ライブラリーの有用性を示せた意義も大きい。よって本論文は、博士(工学)の学位論文に値するものと認める。

2009 年 2 月

審査員 (主査)	早稲田大学	教授	工学博士(早稲田大学)	武岡 真司
(副査)	早稲田大学	教授	工学博士(早稲田大学)	西出 宏之
	早稲田大学	教授	工学博士(早稲田大学)	酒井 清孝

Scuola Superiore Sant' Anna, Assoc. Prof., Ph.D. Arianna Menciassi